

INDICAZIONI INTERPRETATIVE DEL TRACCIATO ELETTROFORETICO DELLE LIPOPROTEINE NELLA SPECIE CANINA

INTERPRETATIVE INDICATIONS OF THE CANINE LIPOPROTEIDOGRAM

ANNA PASQUINI ⁽¹⁾, ELENA LUCHETTI ⁽²⁾, GIOVANNI CARDINI ⁽²⁾

RIASSUNTO

Le lipoproteine plasmatiche sono complessi macromolecolari indispensabili per il trasporto dei lipidi, che differiscono tra loro per dimensione, densità, carica elettrica, composizione lipidica o proteica e funzione metabolica. Alterazioni del metabolismo lipidico che si manifestano con un'iperlipoproteinemia o iperlipidemia, caratterizzata da un aumento di trigliceridi, colesterolo o entrambi, possono comparire primariamente o essere secondarie ad una patologia preesistente. Le iperlipidemie sono normalmente rilevate attraverso l'esecuzione di esami di routine come la determinazione dei livelli ematici di colesterolo e di trigliceridi, ma l'esecuzione di un lipidogramma può essere indicativo dal momento che vi si possono riscontrare alterazioni caratteristiche a seconda del tipo di iperlipidemia e della causa sottostante. Il presente lavoro illustra un metodo elettroforetico, appositamente messo a punto per la specie canina con le principali indicazioni per una corretta ed utile interpretazione. Il lipidogramma standard del cane sano è stato stabilito tramite l'esecuzione di circa 320 lipidogrammi di cani clinicamente sani. La separazione elettroforetica delle lipoproteine del cane eseguita con il metodo sopra descritto può individuare fino a sei diverse frazioni: $\text{p}\alpha$ (prealfa), α_1 (alfa1), α_2 (alfa2), $\text{p}\beta$ (prebeta), β (beta) e κ (chilomicroni).

L'utilizzo di questa metodica, a completamento della determinazione del colesterolo e dei trigliceridi, può dimostrarsi utile per la caratterizzazione di uno stato iperlipidemico, per facilitare la diagnosi dello stato patologico sottostante e per monitorare un trattamento in corso.

Parole chiave: lipidogramma, iperlipidemie, cane.

SUMMARY

The lipids transport in the blood requires complexing with more soluble molecules such as proteins and phospholipids because they are insoluble in water. Triglycerides and cholesterol

⁽¹⁾ Dottorando in Medicina Veterinaria, Anno 2005.

⁽²⁾ Dipartimento di Clinica Veterinaria, Direttore Prof. Fabio Carlucci.

Lavoro eseguito con fondi di Ateneo.

esters are carried by lipoproteins, which are spherical macromolecular complexes made up of a lipid core surrounded by a thin outer membrane. The lipoproteins differ in size, composition, hydrated density, apolipoprotein content, site of formation and electrophoretic mobility. Hyperlipidemia is defined as an increasing plasma concentration of cholesterol or triglycerides or both. The condition may arise as the result of a primary, often inherited, defect in lipoprotein metabolism or as a consequence of an underlying systemic disease. The cholesterol and triglycerides plasma determination is necessary for hyperlipidemia diagnosis but the execution of a lipidogram can be a useful tool to better characterize the type and the cause. The aim of this work was to present a specific, precise and easy to perform electrophoretic technique in order to evaluate the serum lipoprotein profile in dogs. For this purpose, 320 healthy dogs of different sex and age were tested. This technique is able to separate dogs lipoproteins into six classes: $\rho\alpha$ (prealfa), $\alpha 1$ (alfa1), $\alpha 2$ (alfa2), $p\beta$ (prebeta), β (beta) e κ (chilomicroni).

The electrophoretic method can be an important tool to characterize a hyperlipidemic state, to diagnose the eventually associated pathology and to monitor the current therapy.

Key words: lipoproteinogram, hyperlipidemia, dog.

INTRODUZIONE

I lipidi sono molecole idrofobiche scarsamente solubili o insolubili in acqua che, per essere trasportate nel circolo ematico, si legano ad apoproteine con le quali formano complessi idrosolubili, le lipoproteine, che possono raggiungere le cellule di tutto l'organismo. Le lipoproteine plasmatiche differiscono tra loro per dimensione, densità, carica elettrica, composizione lipidica o proteica e funzione metabolica. Esistono infatti molteplici metodi di indagine (es. ultracentrifugazione, precipitazione chimica, mobilità elettroforetica, ecc.) che sfruttando le varie caratteristiche di questi complessi macromolecolari permettono la loro separazione in frazioni (Ford, 1995; Bauer, 1995; Bauer, 2004). Il metodo elettroforetico anche se al momento non presenta un'ampia diffusione per difficoltà di ordine tecnico e interpretativo, è comunque riconosciuto come il metodo migliore per una valida separazione delle lipoproteine. Nel cane, con tale metodo, è possibile individuare almeno 4 grandi categorie di lipoproteine: chilomicroni, lipoproteine a bassissima densità (VLDL), lipoproteine a bassa densità (LDL), lipoproteine ad alta densità (HDL) (Watson & Barrie, 1993; Bauer, 1996, 2004). Nel cane le lipoproteine HDL sono quelle maggiormente presenti e ne sono state individuate alcune sottoclassi: HDL1, HDL2 e HDL3 (Watson & Barrie, 1993; Maldonado e coll., 2002). Le principali frazioni lipoproteiche individuate mediante elettroforesi corrispondono ai seguenti picchi del tracciato: chilomicroni (κ), che non migrano ma rimangono nel punto di origine, $\alpha 1$ che corrispondono alla HDL2 e HDL3, $\alpha 2$ alle HDL1, $p\beta$ alle VLDL e β alle LDL (Bauer, 2004; Watson & Barrie, 1993). In realtà, in ogni classe di lipoproteine, oltre alla componente proteica, sono rappresentati tutti i costituenti lipidici, anche se in quantità variabile (Ford, 1995; Medaille e coll., 1988; Watson & Barrie, 1993).

I chilomicroni sono macromolecole coinvolte nel trasporto dei lipidi alimentari (principalmente trigliceridi) immediatamente dopo il loro assorbimento da parte

dell'intestino tenue. Oltre ai chilomicroni, tutte le altre classi di lipoproteine sono coinvolte nel trasporto e nel metabolismo dei lipidi sintetizzati per via endogena. A digiuno le VLDL sono i trasportatori primari dei trigliceridi endogeni e vengono continuamente sintetizzate dal fegato. Le LDL e le HDL agiscono principalmente da veicolo per il colesterolo e per gli esteri del colesterolo. Le LDL sono un prodotto di degradazione del metabolismo delle VLDL, mentre le HDL vengono prodotte nel fegato. Queste ultime rappresentano le lipoproteine principali nel cane che si mostra più resistente, rispetto ad altre specie compreso l'uomo, ad innalzamenti del colesterolo LDL ed alle patologie associate (Bauer, 1996, 2004; Ford, 1995; Watson & Barrie, 1993).

Spesso il termine iperlipidemia viene usato per descrivere la macroscopica presenza di lipidi in un campione di sangue. In realtà, in caso di reperimento di un plasma o di un siero lattescente, è più corretto parlare di iperlipemia, causata dalla presenza in circolo di trigliceridi. L'iperlipemia postprandiale è una condizione del tutto normale, è invece da considerarsi anormale in un cane a digiuno per un periodo di tempo superiore alle 12 ore. È importante sottolineare che un campione di sangue perfettamente trasparente non è di per se sufficiente ad escludere una iperlipidemia, poiché una ipercolesterolemia in assenza di un'ipertrigliceridemia non è sufficiente a causare una lipemia che è possibile apprezzare visivamente solo quando la trigliceridemia supera il valore di 200 mg/dl. Le iperlipidemie possono essere diagnosticate attraverso l'esecuzione di esami di routine come la determinazione dei livelli ematici di colesterolo e di trigliceridi. È ormai dimostrato che il sospetto di una iperlipidemia comincia a farsi fondato quando i livelli di colesterolo e di trigliceridi superano, nel cane adulto a digiuno, 300 mg/dl e 150 mg/dl rispettivamente. Le iperlipidemie possono essere identificate ancora più dettagliatamente valutando le alterazioni di un normale tracciato elettroforetico delle lipoproteine (Bauer, 2004; Nelson & Couto, 2002; Watson & Barrie, 1993).

L'iperlipidemia può essere idiopatica e svilupparsi come difetto primario del metabolismo delle lipoproteine o essere una conseguenza di una malattia sistemica.

Nel cane l'iperlipidemia è generalmente provocata da un disturbo endocrino o del metabolismo. In alcuni casi uno stato iperlipidemico può dipendere da un errato regime alimentare, caratterizzato da una dieta sbilanciata e particolarmente ricca di grassi soprattutto di origine animale. I relativi traccati elettroforetici mostrano essenzialmente in questi casi un aumento delle frazioni α_1 e α_2 .

Le iperlipidemie idiopatiche nel cane comprendono l'iperlipoproteinemia dello schnauzer nano e del beagle, l'iperchilomicronemia e l'ipercolesterolemia idiopatica.

L'iperlipoproteinemia idiopatica colpisce prevalentemente lo schnauzer nano di media età o anziano. Le alterazioni sono caratterizzate da una marcata ipertrigliceridemia, da una modesta ipercolesterolemia, da un aumento dei chilomicroni sierici, con elettroforesi caratterizzata da una forte rappresentazione di κ , $p\beta$ e β .

Da alcuni Autori è segnalata una ipercolesterolemia classificata come idiopatica nelle razze dobermann e rottweiler caratterizzata dalla mancata associazione con altri disturbi del metabolismo. Le alterazioni sono caratterizzate da una ipercolesterolemia e da un aumento dei livelli ematici di lipoproteine a bassa densità (frazione β).

Tra le principali patologie sottostanti le iperlipidemie secondarie si collocano

l'ipotiroidismo, il diabete mellito, l'iperadrenocorticismo, la pancreatite e patologie renali, soprattutto di tipo degenerativo.

Nei cani ipotiroidei è comune il riscontro di una ipercolesterolemia da leggera a marcata. Secondo Bauer (1996), ai soggetti con valori di colesterolemia superiore a 750 mg/dl dovrebbe essere sempre eseguito un profilo di funzionalità della tiroide; secondo la nostra esperienza, anche valori di colesterolo superiori a 400 mg/dl sono indicativi per la determinazione delle prove di funzionalità tiroidea, tramite la determinazione degli ormoni fT4, T4 e TSH. Nei cani ipotiroidei si verifica un aumento delle frazioni p β , β e α 2, tanto da mostrare nel tracciato elettroforetico un unico picco con andamento caratteristico.

Per quanto riguarda il diabete mellito, cani affetti da questa patologia possono presentare una ipertrigliceridemia marcata ed una ipercolesterolemia modesta. L'aumento delle lipoproteina β è tipico nel cane non trattato e con chetoacidosi. In alcuni casi si possono verificare un aumento dei chilomicroni e delle lipoproteine β 2 e/o p β .

I cani con iperadrenocorticismo possono mostrare in seguito all'iperlipidemia alterazioni del tracciato elettroforetico caratterizzate principalmente da un aumento di lipoproteine β .

I tracciati elettroforetici dei cani affetti da pancreatite con ipertrigliceridemia e/o ipercolesterolemia evidenziano un innalzamento dei chilomicroni e delle VLDL.

Nei cani con insufficienza renale cronica, soprattutto se alimentati con diete ipoproteiche, è possibile osservare un innalzamento della frazione α 2 (Bauer, 2004; Nelson & Couto, 2002; Watson & Barrie, 1993; Zicker e coll., 2000).

Le osservazioni riportate evidenziano chiaramente l'importanza che può assumere l'esecuzione di un lipidogramma ogniqualvolta ci si trovi di fronte ad un'iperlipidemia, sia essa primaria o secondaria, sia come ausilio diagnostico che come test di monitoraggio in corso di terapia.

In realtà, come già accennato, l'elettroforesi delle lipoproteine è un esame poco conosciuto, poco richiesto e da alcuni considerato di scarsa utilità. La principale spiegazione di tale mancata diffusione si trova nel fatto che non sono molti i laboratori veterinari attrezzati alla sua esecuzione ed i laboratori umani in grado di effettuarlo non offrono le corrette linee interpretative. Il lipidogramma del cane mostra infatti notevoli differenze rispetto a quello dell'uomo ed è quindi necessario conoscere l'andamento del grafico, l'ampiezza dei campi di competenza, gli intervalli di riferimento in percentuale (%) di ogni frazione che sono assolutamente specifici per il cane.

Il presente lavoro, illustrando le specifiche caratteristiche di un tipico tracciato di un soggetto sano, si prefigge di fornire le principali indicazioni per un'utile e corretta interpretazione del lipidogramma del cane.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati 320 cani di razza, sesso e età diverse, risultati sani in seguito alla visita clinica, all'emogramma, al profilo biochimico e al tracciato elettroforetico

delle sieroproteine. Tutti i cani considerati presentavano valori di colesterolo totale, colesterolo HDL e trigliceridi all'interno dell'intervallo di riferimento. Le analisi di questi parametri sono state eseguite con spettrofotometro, reagenti e metodiche Seac (Calenzano, FI). Tutti i cani considerati venivano alimentati con diete commerciali a base di mangimi secchi.

A ciascun soggetto è stato prelevato, a digiuno, con siringa 1ml di sangue posto poi in provette con EDTA, dalle quali è stato ottenuto il plasma dopo centrifugazione a 2000 g/min per 6 min. La scelta dell'anticoagulante è fondamentale dal momento che l'EDTA contribuisce a mantenere costante la concentrazione delle frazioni lipoproteiche, bloccando l'attività della lipoproteina lipasi, un enzima plasmatico che favorisce la degradazione dei chilomicroni e delle LDL.

Il plasma ottenuto è stato conservato ad una temperatura di refrigerazione e analizzato entro 15 giorni dal prelievo.

I traccati elettroforetici delle lipoproteine sono stati ottenuti utilizzando l'apparecchio automatico Interlab Microtech ISO 648. Con questo apparecchio è possibile effettuare un'analisi elettroforetica con strisce di acetato di cellulosa (Pasquini e coll., 2004). Con un densitometro che elabora i dati, è possibile ottenere un grafico che può essere interpretato valutandone la morfologia e considerando il valore percentuale di ogni frazione.

I grafici ottenuti sono stati oggetto di studio per quanto riguarda la morfologia al fine di evidenziarne la ripetibilità in condizioni di normalità e di individuare i campi di competenza relativi ad ogni categoria.

Inoltre, i valori ottenuti sono stati analizzati con il programma JMP® al fine di valutarne la distribuzione e individuare i propri intervalli di riferimento, con il metodo dei percentili.

RISULTATI

La separazione elettroforetica delle lipoproteine del cane eseguita con il metodo sopra descritto può individuare fino a sei diverse frazioni: $\rho\alpha$ (prealfa), $\alpha 1$ (alfa1), $\alpha 2$ (alfa2), $\rho\beta$ (prebeta), β (beta) e κ (chilomicroni). La Fig. 1 rappresenta il tracciato standard di un cane sano.

Nella Tab. I vengono riportati i valori medi, espressi in percentuale, per ogni frazione.

Con il metodo dei percentili sono stati calcolati i limiti degli intervalli di riferimento, raccolti in Tab. II.

DISCUSSIONE

La Fig. 1 mostra la regolare morfologia del grafico di un lipidogramma selezionato in seguito all'osservazione morfologica di tutti i grafici relativi ai soggetti sani esa-

	pα	α1	α2	pβ	β	k
Valori medi %	2.10	38.98	33.05	12.06	12.42	1.39

Tab. I. Valori medi (%) di ogni frazione lipoproteica calcolati in 320 soggetti. *Mean values of lipoprotein fractions(%) derived from 320 normal animals.*

	pα	α1	α2	pβ	β	k
Range di riferimento %	1.80 2.46	37.91 40.57	31.48 35.01	9.93 12.98	11.11 14.03	1.32 2.41

Tab. II. Range di riferimento (%) di ogni frazione lipoproteica, calcolati in 320 soggetti. *Reference ranges (%) of lipoprotein fraction derived from 320 normal animals.*

minati. E' stato inoltre osservato che ogni frazione corrisponde ad uno specifico campo di competenza. Nel punto di deposito del siero sulla striscia di acetato rimangono i chilomicroni che non compiono nessuna migrazione. Di seguito si posiziona la banda relativa alla migrazione della frazione β e quindi quella della frazione pβ, che attraverso questo metodo è stata osservata nel 88% dei casi. La componente α nel tracciato lipoproteico del cane sano è risultata essere la predominante, nel 100% dei casi e sono

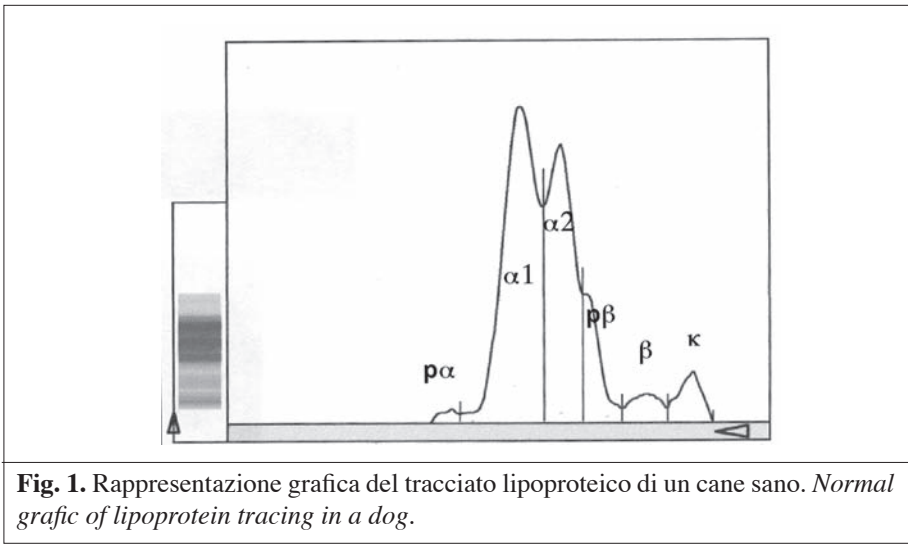


Fig. 1. Rappresentazione grafica del tracciato lipoproteico di un cane sano. *Normal graphic of lipoprotein tracing in a dog.*

ben distinguibili due bande, corrispondenti alle frazioni α_2 e α_1 . Infine è possibile evidenziare che dopo le frazioni α compare un'ulteriore piccola banda rispondente alle $\rho\alpha$. Queste sono normalmente rilevate nell'uomo mentre non vi sono, in letteratura, dati riguardanti il cane. Le modalità di prelievo e di conservazione del campione sono aspetti da non sottovalutare poiché possono influenzare la qualità dell'analisi elettroforetica; in particolare abbiamo osservato, in 60 campioni, che un'emolisi marcata è responsabile dell'innalzamento della frazione β .

Le considerazioni raggiunte costituiscono i presupposti per l'utilizzo della metodica in aggiunta alla determinazione del colesterolo e dei trigliceridi per una caratterizzazione di uno stato iperlipidemico, per facilitare la diagnosi dello stato patologico sottostante e per monitorare un trattamento in corso.

BIBLIOGRAFIA

- BARRIE J., WATSON T.D.G. (1995) Hyperlipidemia. In: Kirk R.W. & Bonagura J.D. "Current Veterinari Therapy XII", W.B. Saunders Company, Philadelphia 430-434
- BAUER J.E. (1996). Comparative lipid and lipoprotein metabolism. *Vet. Clin. Pathol.*, 25: 49-56.
- BAUER J.E. (2004). Lipoprotein-mediated transfer of dietary and synthesized lipids and lipid abnormalities of dogs and cats. *J. Vet. Med. Ass.*, 224(5): 668-75
- FORD R.B. (1995). Canine hyperlipidemia. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. "Textbook of Veterinary Internal Medicine" W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1414-1419.
- MALDONADO E.N., CASANAVE E.B., AVELDANO M.I. (2002) Major plasma lipids and fatty acids in four HDL mammals. *Comp. Bioch. Physiol.*, 132: 297-303.
- MEDAILLE C., DE LA FARGE F., BRAUN J.P., RÉGNIER A., RICO A.G., VALDIGUIÈ P. (1988). *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.*, 5: 343-352.
- NELSON R.W., COUTO C.G. (2002). *Medicina Interna del cane e del gatto*. Masson, Milano 763-767.
- PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G. (2004). Prospettive di utilizzo del lipidogramma nella specie canina. *Congr. Naz. SIDiLV.*, VI: 53-54.
- WATSON T.D.G., BARRIE J. (1993). Lipoprotein metabolism and hyperlipidemia in the dog and cat. A review. *J. Small Anim. Pract.*, 34: 479-487.
- ZICKER S.C., FORD R.B., NELSON R.W., KIRK C.A. (2000). Endocrine and lipid disorders, in Hand M.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P. "Small Animal Clinical Nutrition" Mark Morris Institute, 849-880.